

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang dan LSIH Universitas Brawijaya Malang sejak bulan April hingga Oktober 2016

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: beaker glass, autoclave, petridish, laminar air flow cabinet (LAFB), pH meter, jarum ose, spatula, bunsen burner, shaker, tabung reaksi, Erlenmeyer 250 ml, centrifuge, vortex, lemari es, timbangan analitik, peralatan elektroforesis horizontal, sisir elektroforesis (well former dan Perspex strip), mikro pipet (1-10 µl, 10-100 µl, dan 100-1000 µl), micro tip (putih/ 1-10 µl, kuning/ 10-100 µl, biru/ 100-1000 µl), tabung eppendorf (1,5 ml), sarung tangan karet, masker, microwave, timer, gel doc, mortar, martir, saringan/ kain saring, baskom,

Bahan yang digunakan ialah bahan media pepton (0.4% difco bacto pepton, 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), NaOH 0.5 N, alkohol 70%, alkohol 96%, aquadest, aquadest steril, aluminium foil, karet gelang, tissue, plastik seal, kertas parafilm, isolat *Bradyrhizobium japonicum*, daun sirsak, daun pepaya, daun mimba, umbi bawang putih, daun tembakau rajangan, agarose, agar-agar mikrobiologis, lysozyme, glukosa, etylene diamine tetra acetat (EDTA), Tris-HCl, NaOH, sodium dedocyl sulfate (SDS), sodium asetat, ethanol 96%, ethanol 70%,

bromophenol blue dye (BPB), xylene cyanol, ethidium bromide (EtBr), detergent, dan minyak tanah.

3.3. Metode Pelaksanaan

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas seperti jarum ose, spatula, dan petridish dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet gelang. Tabung reaksi dimasukkan kedalam plastik tahan panas dengan mulut tabung menghadap ke bawah. Mulut erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan plastik kemudian diikat dengan menggunakan karet gelang.

Bahan-bahan yang perlu disterilisasi antara lain media pepton agar, media pepton cair, dan aquadest. Alat dan bahan kemudian ditata di dalam tray dan disterilisasi. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoclave selama ± 60 menit untuk alat-alat gelas dan ± 20 menit untuk bahan pada suhu 121°C dan tekanan 15 Psi.

Membuat Media Pepton

Media yang digunakan untuk isolasi *Bradyrhizobium japonicum* adalah media pepton. Ada 2 macam media pepton yang akan dibuat yaitu media pepton agar dan media pepton cair. Pembuatan media pepton agar (PA) dilakukan dengan mencampur 0.4% Difco Bacto Pepton dengan 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam beaker glass 1000 ml, kemudian ditambahkan aquadest steril hingga mencapai volume 500 ml. media kemudian dipanaskan hingga mendidih dan diukur tingkat kemasamannya hingga mencapai pH 6,8. Apabila pH media terlalu asam (<6.8) maka perlu dilakukan penambahan NaOH 0.5 N dengan cara ditetesi sedikit demi

sedikit hingga pH mencapai 6,8. Apabila pH media terlalu basa ($> 6,8$) maka perlu dilakukan penambahan HCl dengan cara ditetesi sedikit demi sedikit hingga pH mencapai 6,8.

Setelah didapatkan pH yang sesuai, maka media ditambahkan aquadest hingga volume mencapai 1000 ml kemudian ditambahkan dengan agar-agar mikrobiologi sebanyak 15 g/l. Media diaduk perlahan hingga agar-agar terlarut sambil sesekali memanaskan media kedalam microwave agar tidak ada agar-agar mikrobiologi yang menggumpal. Proses dilakukan terus menerus hingga agar-agar mikrobiologi larut dan media pepton mendidih.

Media pepton agar yang telah mendidih kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 ml, masing masing erlenmeyer diisi dengan 250 ml media pepton agar. Mulut erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil dan plastik tahan panas lalu diikat dengan karet gelang hingga tertutup rapat.

Proses pembuatan media pepton cair dilakukan dengan cara yang hampir sama dengan pembuatan media pepton agar. Namun pada pembuatan media pepton cair tidak dilakukan penambahan agar-agar mikrobiologi. Setelah media pepton cair mendidih, media pepton cair kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml dan masing-masing erlenmeyer diisi dengan 100 ml media pepton cair. Mulut erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil dan plastik tahan panas lalu diikat dengan karet gelang. Setelah media dingin, selanjutnya media pepton dimasukkan kedalam *autoclave* lalu kemudian disterilisasi menggunakan autoclave selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 Psi.

Peremajaan Bakteri pada Media Pepton Agar (PA)

Media pepton agar yang telah disiapkan dipanaskan kembali dalam microwave agar tidak menggumpal (mencair). Media PA kemudian dituang kedalam petridish sebanyak \pm 30-40 ml di dalam Laminar Air Flow Cabinet (LAFC). Petridish yang telah diisi media pepton agar kemudian ditutup dan dirapatkan dengan plastik seal. Media pepton agar kemudian dibiarkan hingga dingin dan mengeras kemudian dibalik.

Peremajaan bakteri dilakukan di dalam LAFC dengan cara menyalakan lampu UV selama 60 menit lalu kemudian mematikan lampu UV dan menyalakan blower dan lampu neon. Bakteri *Bradyrhizobium japonicum* diambil dari koleksi Idiyah (2015) lalu dikulturkan kedalam media baru dengan cara menggoreskan bakteri *Bradyrhizobium japonicum* yang telah diambil dengan menggunakan jarum ose kedalam media pepton agar baru yang baru. Jarum ose selalu disterilkan setiap kali akan digunakan dengan cara mencelupkan ujung jarum ose ke dalam alkohol 70% dan kemudian membakarnya pada nyala bunsen hingga besi jarum ose kemerahan dan dibiarkan mendingin sebelum dipergunakan kembali. Petridish ditutup kembali dan dirapatkan dengan plastik seal agar tidak ada udara yang masuk. Petridish kemudian dimasukkan kedalam inkubator dan diletakkan secara terbalik pada suhu 25° C selama 5 hari.

Bakteri *Bradyrhizobium japonicum* yang telah diremajakan ke dalam petridish kemudian di subkultur ke dalam tabung reaksi dengan cara menggoreskan bakteri *Bradyrhizobium japonicum* ke dalam media pepton agar yang telah di tuang ke dalam tabung reaksi secara zigzag. Jarum ose selalu

disterilkan setiap kali akan digunakan dengan cara mencelupkan ujung jarum ose ke dalam alkohol 70% dan kemudian membakarnya pada nyala bunsen hingga besi jarum ose kemerahan dan dibiarkan mendingin sebelum dipergunakan kembali. Tabung reaksi kemudian ditutup hingga rapat dan di lapisi plastik seal agar tidak ada udara yang masuk. Tabung reaksi kemudian ditata ke dalam wadah kecil dengan posisi miring hingga 80° lalu disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan Pestisida Nabati Daun Mimba

Pembuatan pestisida nabati daun mimba dilakukan sesuai dengan metode Balai Pengkajian Teknologi Pertanian NTB (2011) dengan cara menumbuk halus 100 g daun mimba dan menambahkan 1 liter air lalu mengaduknya hingga tercampur rata. Setelah pestisida tercampur rata kemudian wadah pestisida ditutup hingga rapat dan membiarkannya selama 1 malam. Setelah daun direndam selama 1 malam, larutan pestisida kemudian diaduk kembali dan disaring dengan menggunakan saringan. Larutan pestisida kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan Pestisida Nabati Daun Tembakau Rajangan

pembuatan pestisida nabati daun tembakau rajangan dilakukan sesuai dengan metode Balai Pengkajian Teknologi Pertanian NTB (2011) dengan cara merendam 31,25 g daun tembakau rajangan ke dalam larutan yang berisi 1 l air dan ¼ sdt deterjen. Larutan kemudian diaduk hingga tercampur dan dibiarkan selama 1 malam dalam wadah tertutup. Setelah larutan dibiarkan selama 1 malam, maka penutup wadah dibuka dan kemudian larutan disaring dengan

menggunakan saringan. Larutan pestisida kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan Pestisida Nabati Daun Pepaya

Pembuatan pestisida nabati daun pepaya dilakukan sesuai dengan metode Balai Pengkajian Teknologi Pertanian NTB (2011) dengan cara menumbuk halus 100 g daun pepaya dan memasukkannya ke dalam larutan yang berisi 1 l air, 4 ml minyak tanah, dan 3 g deterjen. Larutan kemudian diaduk hingga tercampur dan menutupnya hingga rapat lalu mendiampkannya selama 1 malam. Setelah larutan dibiarkan selama 1 malam, kemudian penutup wadah dibuka dan larutan disaring dengan menggunakan saringan. Larutan pestisida kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan Pestisida Nabati Daun Sirsak

Pembuatan pestisida nabati daun sirsak dilakukan sesuai dengan metode Balai Pengkajian Teknologi Pertanian NTB (2011) dengan cara menumbuk halus 20 lembar daun sirsak dan memasukkannya ke dalam larutan yang berisi 1 l air dan 3 g deterjen. Larutan kemudian diaduk hingga tercampur dan menutupnya hingga rapat lalu mendiampkannya selama 1 malam. Setelah larutan dibiarkan selama 1 malam, kemudian penutup wadah dibuka dan larutan disaring dengan menggunakan saringan. Larutan pestisida kemudian disimpan dalam wadah yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan Pestisida Nabati Umbi Bawang Putih

Pembuatan pestisida nabati umbi bawang putih dilakukan sesuai dengan metode Balai Pengkajian Teknologi Pertanian NTB (2011) dengan cara

menumbuk halus 10 g umbi bawang putih dan memasukannya ke dalam larutan yang berisi 1 l air dan 3 g deterjen, dan 2 ml minyak tanah. Larutan kemudian diaduk hingga tercampur dan menutupnya hingga rapat lalu mendiamkannya selama 1 malam. Setelah larutan dibiarkan selama 1 malam, kemudian penutup wadah dibuka dan larutan disaring dengan menggunakan saringan. Larutan pestisida kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari pendingin.

Perbanyakan Bakteri pada Media Pepton Cair

Perbanyakan bakteri pada media pepton cair dilakukan dengan cara mengambil 1 koloni bakteri *Bradyrhizobium japonicum* yang telah dibiakkan dalam media pepton agar lalu memindahkannya ke dalam erlen meyer 100 ml yang berisi 100 ml media pepton cair menggunakan jarum ose. Proses pemindahan dilakukan di dalam Laminar Air Flow Cabinet (LAFC). Media pepton cair yang berisi koloni bakteri *Bradyrhizobium japonicum* diberi perlakuan insektisida hayati sebagai berikut:

- N₀ : Tanpa Insektisida Nabati
- N₁ : Insektisida Nabati daun mimba (H₁)
- N₂ : Insektisida Nabati daun tembakau rajangan (H₂)
- N₃ : Insektisida Nabati daun pepaya (H₃)
- N₄ : Insektisida Nabati daun sirsak (H₄)
- N₅ : Insektisida Nabati umbi bawang putih (H₅)

Selanjutnya biakan bakteri diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan putar 125 rpm selama 5 hari.

Prosedur Isolasi Plasmid

Prosedur Isolasi Plasmid dilakukan dengan metode CTAB (cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) yang sudah dimodifikasi menurut Corkil dan Rapley (2008). Metode ini menghasilkan pita DNA yang berukuran tebal dan dapat memisahkan DNA dari polisakarida karena adanya perbedaan karakteristik kelarutan. Selain DNA, dengan penggunaan metode ini juga akan diperoleh RNA dengan pita tipis yang terletak jauh berada di bawah pita DNA. Sebelum dilakukan metode ini, maka sebelumnya perlu dilakukan pembuatan larutan lisis alkali sebagai berikut:

Larutan I

Proses pembuatan larutan I diawali dengan menimbang semua bahan larutan I yang terdiri dari 40 mg *lysozyme* (2 mg/ml), 0,18 g Glukosa (50mM), 0,06 g EDTA (10mM), dan 0,08 Tris-HCl (25mM). Bahan yang telah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam botol selai yang telah steril lalu ditambahkan dH₂O hingga volume mencapai 20 ml lalu disterilkan dalam autoclave pada suhu 121° C dan tekanan 15 psi. Larutan kemudian disimpan dalam lemari pendingin dan hanya dikeluarkan apabila akan dipergunakan saja.

Larutan II

Proses pembuatan larutan II diawali dengan menimbang semua bahan larutan II yang terdiri dari 0,8 g NaOH (0,2 N) dan 1 g SDS 1% lalu kemudian bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam botol selai yang telah steril. Setelah semua bahan larutan dimasukkan ke dalam botol, maka selanjutnya ditambahkan dH₂O hingga volume mencapai 100 ml dan disimpan pada suhu ruang.

Larutan III

Proses pembuatan larutan III diawali dengan Menimbang bahan larutan III yaitu Sodium asetat 3M sebanyak 7.38 g. Bahan tersebut dilarutkan dengan sedikit air dan diatur keasamannya menggunakan asam asetat hingga pH mencapai 4.8 kemudian ditambahkan dH₂O hingga volume mencapai 30 ml dan disimpan pada suhu ruang.

Isolasi Plasmid

1. Mengisi tube dengan 1500 μ l kultur bakteri lalu kemudian mensentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4° C. Jika pellet yang didapat terlalu sedikit, maka proses dapat diulangi kembali hingga 5 kali.
2. Membuang supernatant. Pellet dibiarkan hingga sekering mungkin dengan cara membalikkan tube secara perlahan pada permukaan tissue agar pellet DNA tidak ikut terbang.
3. Menambahkan 100 μ l larutan I (lihat pembuatan larutan I) lalu kemudian melakukan *vortex* agar larutan tercampur dengan sempurna.
4. Menambahkan 150 μ l larutan II (lihat pembuatan larutan II), menutup tube dan menghomogenkan larutan dengan cara membolak-balikkan tube secara perlahan.
5. Menambahkan 200 μ l larutan III (lihat pembuatan larutan III), menutup tube dan menghomogenkan larutan dengan cara membolak-balikkan tube secara perlahan.

6. Menyimpan tube berisi larutan kedalam lemari es selama 15 menit agar sampel tidak rusak saat diberikan ethanol absolute.
7. Mencentrifuge dengan kecepatan 13,000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C.
8. Mengambil supernatant dan memindahkannya kedalam tube baru.
9. Menambahkan ethanol absolute sebanyak 2 kali volume supernatant lalu menghomogenkan dengan vortex
10. Mencentrifuge dengan kecepatan 13,000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C.
11. Membuang supernatant dan membiarkan endapan serta tube hingga sekering mungkin dengan cara membalikkan tube secara perlahan pada permukaan tissue.
12. Mencuci endapan dengan ethanol 70% sebanyak 200 µl lalu dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tube secara perlahan.
13. Mencentrifuge dengan kecepatan 13,000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C, dan kemudian membuang supernatant.
14. Mengering anginkan pellet hingga tidak ada ethanol yang tersisa.
15. Menambahkan buffer TE sebanyak 30 µl setelah pellet kering yaitu setelah 2 hari.

Elektroforesis/ Running DNA Plasmid

Sebelum elektroforesis dilakukan, maka perlu membuat gel agarose 1% dilakukan dengan cara menimbang 1 g agarose dan memasukkannya ke dalam botol duran 250 ml, kemudian menambahkannya dengan TBE 1x sebanyak 100 ml. Larutan kemudian diaduk hingga homogen dengan menggunakan spatula. Setelah larutan homogen, larutan kemudian dipanaskan dengan microwave hingga

mendidih sambil sesekali dikeluarkan untuk diaduk agar agarose larut secara merata. Setelah mendidih, agarose dibiarkan hingga menjadi agak dingin dan kemudian dituang ke dalam cetakan gel agarose dan menunggu selama 30 menit hingga agarose padat.

Kemudian mengelektroforesis dengan cara, membersihkan alat elektroforesis, memasukkan bufer loading berupa TBE 1 x kedalam tabung elektroforesis dan kemudian memaskan gel agarose yang telah dibuat sebelumnya. Menyiapkan 1,5 μ l BPB (*Bromophenol Blue*) keatas kertas parafilm, lalu mencampurnya dengan 3 μ l pellet DNA plasmid bakteri yang telah diberi larutan TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 dan 1mM EDTA pH 8,0). Setelah sampel siap kemudian memasukan sampel DNA yang sudah dicampur dengan BPB kedalam sumur gel dengan micropipette 1-10 μ l dan menutup tabung elektroforesis. Mengatur elektroforesis pada voltase 60 volt dan menunggu hingga 60 menit.

Memindahkan gel hasil elektroforesis ke dalam larutan Ethidium Bromida (EtBr) dan merendamnya 20 menit, kemudian mencuci gel selama 5 menit dengan air yang mengalir. Gel kemudian dimasukkan kedalam gel dokumen dan kemudian memotretnya dengan foto Polaroid.